

Aus der
Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin
des Klinikums der Universität München
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Peter Bartenstein

**Etablierung und Evaluierung multiparametrischer nuklearmedizinischer
Verfahren zur Bestimmung der myokardialen Funktion und
pathophysiologischer Veränderungen unter Berücksichtigung
therapeutischer Optionen**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia Legendi
im Fach

NUKLEARMEDIZIN

vorgelegt von

Dr. med. Andrei Stefan Todica
geboren in Temeschburg

München 2017

*„Die Gedanken sind frei,
wer kann sie erraten,
sie fliehen vorbei
wie nächtliche Schatten.
Kein Mensch kann sie wissen,
kein Jäger erschießen,
es bleibt dabei:
die Gedanken sind frei.“
- deutsches Volkslied um 1780*

Der kumulativen Habilitationsschrift liegen folgende Originalarbeiten zu Grunde:

1. Erroneous cardiac ECG-gated PET list-mode trigger events can be retrospectively identified and replaced by an offline reprocessing approach: first results in rodents. Böning G, **Todica A**, Vai A, Lehner S, Xiong G, Mille E, Ilhan H, la Fougère C, Bartenstein P, Hacker M. Phys Med Biol. 2013 Nov 21;58(22):7937-59.
2. Derivation of a respiration trigger signal in small animal list-mode PET based on respiration-induced variations of the ECG signal. **Todica A**, Lehner S, Wang H, Zacherl MJ, Nekolla K, Mille E, Xiong G, Bartenstein P, la Fougère C, Hacker M, Böning G. J Nucl Cardiol. 2016 Feb;23(1):73-83.
3. [⁶⁸Ga]-albumin-PET in the monitoring of left ventricular function in murine models of ischemic and dilated cardiomyopathy: comparison with cardiac MRI. **Todica A**, Brunner S, Böning G, Lehner S, Nekolla SG, Wildgruber M, Übleis C, Wängler C, Sauter M, Klingel K, Cumming P, Bartenstein P, Schirrmacher R, Franz WM, Hacker M. Mol Imaging Biol. 2013 Aug;15(4):441-9.
4. Left ventricular functional assessment in murine models of ischemic and dilated cardiomyopathy using [¹⁸F]FDG-PET: comparison with cardiac MRI and monitoring erythropoietin therapy. Brunner S, **Todica A**, Böning G, Nekolla SG, Wildgruber M, Lehner S, Sauter M, Ubleis C, Klingel K, Cumming P, Franz WM, Hacker M. EJNMMI Res. 2012 Aug 3;2(1):43.
5. In-vivo monitoring of erythropoietin treatment after myocardial infarction in mice with [⁶⁸Ga]Annexin A5 and [¹⁸F]FDG PET. **Todica A**, Zacherl MJ, Wang H, Böning G, Jansen NL, Wängler C, Bartenstein P, Kreissl MC, Hacker M, Brunner S, Lehner S. J Nucl Cardiol. 2014 Dec;21(6):1191-9.

6. Gross L, Paintmayer L, Lehner S, Brandl L, Brenner C, Grabmaier U, Huber B, Bartenstein P, Theiss HD, Franz WM, Massberg S, **Todica A**, Brunner S. FDG-PET reveals improved cardiac regeneration and attenuated adverse remodeling following Sitagliptin + G-CSF therapy after acute myocardial infarction. Eur Heart J Cardiovasc Imaging. 2016 Feb;17(2):136-45.
7. Monitoring of Cardiac Remodeling in a Mouse Model of Pressure-Overload Left Ventricular Hypertrophy with [(18)F]FDG MicroPET. **Todica A**, Beetz NL, Günther L, Zacherl MJ, Grabmaier U, Huber B, Bartenstein P, Brunner S, Lehner S. Mol Imaging Biol. 2017 Aug 29.

Inhaltsverzeichnis

1. Vorwort	6
2. Wissenschaftliche Grundlagen	9
I. Bildgebung.....	9
II. Tiermodelle	11
III. Therapieregime	13
3. Eigene Arbeiten	16
4. Ergebnisse	17
I. Retrospektive Bearbeitung der EKG Triggerung von Kleintier PET list-mode Daten...	17
II. Ableitung eines Atemtriggersignals für die list-mode Kleintier-PET anhand der Atemmodulation des EKG-Signals	21
III. Berechnung linksventrikulärer Funktionsparameter bei Mäusen mit ischämischer bzw. dilatativer Kardiomyopathie mittels EKG-getriggelter [68Ga]-Albumin PET im Vergleich zur Magnetresonanztomographie.....	24
IV. Berechnung linksventrikulärer Funktionsparameter bei Mäusen mit ischämischer bzw. dilatativer Kardiomyopathie mittels EKG-getriggelter [18F]FDG-PET: Vergleich mit Magnetresonanztomographie und Monitoring einer Erythropoetin-Therapie	26
V. In-vivo Monitoring einer Erythropoetin (EPO) Therapie im Infarktmodell der Maus mittels [68Ga]-Annexin A5 und [18F]-FDG PET	29
VI. Evaluierung und Monitoring der „dualen Stammzelltherapie“ mittels G-CSF und Sitagliptin im Infarktmodell der Maus	31
VII. Monitoring der linksventrikulären Funktion, Hypertrophie und Narbenlast im Mausmodell der kardialen Hypertrophie mittels [18F]FDG-PET	33
5. Zusammenfassung	36
6. Literaturverzeichnis.....	37
7. Danksagung	41

1. Vorwort

Weltweit betrachtet gehören Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität (1). Auch in Deutschland nahmen im Jahr 2015 die Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems mit 39% aller Todesursachen eine herausragende Stellung ein, noch weit vor bösartigen Neubildungen (25%) oder den Krankheiten des Atmungssystems (7%) (Statistisches Bundesamt 2015). Das Lebenszeitrisko eines heute 40 Jahre alten Menschen an Herzinsuffizienz zu erkranken liegt bei ca. 20% (2). Trotz zunehmender medizinischer Fortschritte ist die Mortalität weiterhin hoch und etwa 50% der Patienten versterben innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung (2).

Moderne Bildgebungsverfahren, wie sie z.T. in der Nuklearmedizin ihre Anwendung finden, können das Therapieansprechen evaluieren, bei der Selektionierung der Patienten behilflich sein, die von einer spezifischen Therapie profitieren, und mögliche „Therapieversager“ vor unnötigen, teuren und nebenwirkungsreichen Behandlung bewahren. Zudem ermöglichen sie die Identifizierung von Hochrisiko-Patienten, die einer engmaschigen Nachsorge bedürfen.

Grundlage der nuklearmedizinischen Bildgebung ist das sogenannte Tracer-Prinzip. Hierbei wird eine schwach radioaktive Substanz (Radiopharmakon bzw. Radiodiagnostikum) in den Körper, in aller Regel über die Blutbahn, eingebracht. In Abhängigkeit des chemischen und physiologischen Verhaltens der Substanz kommt es zu einer Radiopharmaka-spezifischen Verteilung im Körper und Akkumulation in den einzelnen Organen. Auf Grund des radioaktiven Zerfalls können diese spezifischen Verteilungen im Körper z.B. mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) registriert werden.

Die nuklearmedizinische Bildgebung bietet dadurch die Möglichkeit nicht-invasiv biochemische und physiologische Prozesse in-vivo darzustellen sowie deren krankhafte Veränderungen zu lokalisieren. Die PET hat auf Grund ihrer Sensitivität im picomolaren Bereich und dem Auflösungsvermögen von 1-2 mm zunehmend an Bedeutung gewonnen. Sie ermöglicht, neben dem Einsatz im

Menschen, die Option eines nicht-invasiven, repetitiven und quantitativen Therapiemonitorings im Tiermodell (3-6).

Da die zerfallsabhängige Datenakquisition Minuten bis Stunden dauern kann ist sie häufig anfällig für Bewegungsartefakte (z.B. Herz- oder Atembewegung). Dies führt einerseits zu unscharfen Bildern, ermöglicht jedoch andererseits, wie z.B. durch die Anwendung von Bewegungskorrekturen basierend auf EKG-Triggerung, die Nachbildung der Herzbewegung und hierdurch die Untersuchung der linksventrikulären Funktion und Bestimmung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF).

Dieser kardiale Surrogat-Endpunkt (LVEF) stellt mitunter einen unabhängigen Prädiktor für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität dar (7,8). Es gibt verschiedene Techniken, die Funktion des linken Ventrikels in präklinischen Studien zu bestimmen. Mit Hilfe eines Mikrokatheters können die Druck-Volumen-Verhältnisse gemessen werden, mit der Einschränkung, dass diese invasive Methode keine seriellen Untersuchungen bei Kleintieren zulässt (9). Die Echokardiographie ist ein häufig genutztes Verfahren zur Bestimmung der linksventrikulären Pumpfunktion, jedoch besitzt sie eine hohe intra- und interobserver Variabilität in Kleintieren (10). Magnetresonanztomographie (MRT) und Blutpool-Szintigraphie in SPECT (Single Photonen Emissions Computer Tomographie) Technik gelten als Goldstandard bei der Auswertung der kardialen Funktion (11-13). Ein weiteres häufig genutztes Verfahren und eine Alternative für die genannten Methoden ist die PET mit dem Glukose-Analogon [18F]-Fluorodeoxyglukose ([18F]-FDG), welche neben der Analyse der ventrikulären Funktion, auch die Möglichkeit der myokardialen Vitalitätsdiagnostik bietet (14,15).

Zahlreiche Ursachen können zu einer Herzinsuffizienz führen. Die häufigsten Ursachen sind die ischämische Kardiomyopathie (ICM) sowie der Bluthochdruck jedoch auch der Diabetes, die Degeneration der Herzklappen, virale Infektionen, der Alkoholabusus und Chemotherapien können zu einer

Herzinsuffizienz führen (16). All diese Ursachen führen zu einer Schädigung der Kardiomyozyten wodurch es im Verlauf zu einem kardialen Remodeling mit einer progredienten Kardiomyopathie und einer zunehmenden Verschlechterung der Pumpfunktion kommen kann (17-21). Beim Fortschreiten der Erkrankung kommt es zu Veränderungen von Form und Größe des linken Ventrikels, zu einer progredienten Dilatation und zur Aktivierung neuroendokriner Achsen, die diese Prozesse unterhalten. Aufgrund der hohen Morbidität und Mortalität bei herzinsuffizienten Patienten ist es wichtig neue Therapieansätze zu finden und zu evaluieren (20,21). Eine suffiziente Risikostratifizierung sowie die Möglichkeiten eines nicht-invasiven, seriellen in-vivo Therapiemonitorings sind hierfür von außerordentlicher Bedeutung.

Vor dem beschriebenen Hintergrund stellen sich die wichtigsten Ziele des Habitationsprojektes wie folgt dar:

1. Entwicklung und Etablierung neuer Methoden zur retrospektiven Generierung von EKG und respiratorischen Triggerpunkten im Kleintiermodell
2. Vergleich nuklearmedizinischer Verfahren zur Bestimmung der linksventrikulären Funktion in Kleintieren mit dem Referenzstandard MRT und deren praktische Anwendung in unterschiedenen Krankheitsmodellen
3. Monitoring des Krankheitsverlaufes in unterschiedlichen Tiermodellen und der Einfluss verschiedener Therapien auf den Krankheitsverlauf

2. Wissenschaftliche Grundlagen

I. Bildgebung

Für die PET Bildgebung werden zumeist radioaktiv markierte Pharmaka (Radiopharmaka) verwendet (in seltenen Fällen auch direkt radioaktive Nuklidverbindungen) um Stoffwechselvorgänge *in vivo* darzustellen. Beim radioaktiven Zerfall werden Positronen emittiert welche nach kurzer Flugstrecke (wenige Millimeter) in Materie mit Elektronen zusammenstoßen. Dies führt zur gegenseitigen Annihilation und Freisetzung von zwei 511 keV γ -Quanten, die sich in einem Winkel von 180° voneinander entfernen (22). Diese Zerfälle werden durch die ringförmig angeordneten Detektoren des PET-Scanners registriert. Dabei wird bei modernen Scannern der Zeitpunkt des registrierten Zerfalls in Form einer Liste (list-mode) abgespeichert. Zur Bewegungskorrektur werden ergänzend EKG- und Atemkurven registriert und getriggert. Bei der Triggerung wird, z.B. bei einem Kurvenmaximum oder einem Maximum der ersten Ableitung, ein Triggersignal in den PET-Scanner eingespeist und zusammen mit sämtlichen PET-Koinzidenzen im „list-mode“ Format gespeichert. Die Triggerung ermöglicht es die im list-mode Format gespeicherten Koinzidenzen auf gleich lange Zeitintervalle aufzuteilen (Histogrammierung). Das aus dem entstandenen Sinogramm rekonstruierte dreidimensionale Bild entspricht der Summation aller während der Akquisition registrierten Zerfälle in der jeweiligen Herz- und / oder Atemphase (23,24). Diese Methode erlaubt, neben der Bewegungskorrektur, auch die Bestimmung der linksventrikulären Pumpfunktion für Radiotracer, die den kardialen Blutpool repräsentieren oder im Myokard akkumuliert werden.

Bevorzugte Energiequelle für das Herz sind freie Fettsäuren, die unter Sauerstoffverbrauch in den Mitochondrien der Kardiomyozyten verstoffwechselt werden (25). Durch Stressfaktoren wie körperliche Belastung, Ischämie und Hypoxie oder auch Insulinausschüttung kann das Herz, innerhalb kürzester Zeit, durch aktiven Transport der Glukosetransporterproteine 1 und insbesondere 4 an die Zelloberfläche, auf Glukose als Energiesubstrat umstellen

(26). Hierdurch kann [18F]-FDG aktiv in die Myokardzelle aufgenommen und nach Phosphorylierung durch das Enzym Hexokinase zu [18F]-FDG-6-Phosphat irreversibel in der Zelle gespeichert werden (25). Da nur vitales Gewebe einen relevanten Glukosemetabolismus aufweist kann die [18F]-FDG PET zur Beurteilung der Zellvitalität und zur Quantifizierung von Stoffwechseldefekten (myokardialen Narben) verwendet werden (25). Dies hat [18F]-FDG zu einem etablierten nuklearmedizinischen Tracer in der klinischen Routine und der präklinischen Forschung werden lassen.

Eine gewisse Limitation der [18F]-FDG PET ergibt sich bei der Bestimmung der linksventrikulären Pumpfunktion in Tieren mit einer ischämischen Kardiomyopathie (27). Auf Grund der fehlenden Traceranreicherung im infarzierten Myokard kann es bei der Konturerkennung zu einer inkorrekten Delineation des Endokards kommen und somit zu einer Überschätzung der tatsächlichen LVEF. Da mit zunehmendem Alter der Perfusionsstörung die Infarktnarbe zunehmend dilatiert kann dies, insbesondere bei ausgeprägten Stoffwechseldefekten, bei seriellen Messungen über einen längeren Zeitraum zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen. Hierbei können Blutpool-Tracer, wie das evaluierte [68Ga]-Albumin (28), bei der Bestimmung der linksventrikulären Funktion der [18F]-FDG PET im Infarktmodell überlegen sein.

In Studien, in denen das radioaktiv markierte Annexin A5 angewendet wurde, konnte gezeigt werden, dass dieses Radiopharmakon zur Visualisierung und Quantifizierung der Phosphatidylserin-Externalisierung im Bereich der äußeren Plasmamembran genutzt werden kann (29-31). Annexin A5 besitzt eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin welches während der Apoptose und anderen Formen des Zelltodes an der Zelloberfläche präsentiert wird (30,32). Dadurch hat das radioaktiv markierte Annexin A5 als PET-Tracer das Potenzial die Apoptoserate zu einem frühen Zeitpunkt darzustellen und ermöglicht hierdurch eine Risikostratifizierung und das Monitoring von kardioprotektiven Therapien (33).

II. Tiermodelle

Für die Etablierung und Evaluierung nuklearmedizinischer Verfahren zur Bestimmung der myokardialen Funktion und Untersuchung pathophysiologischer Veränderungen wurden verschiedene Tiermodelle verwendet. Durch die verwendeten Tiermodelle sollte ein breites Spektrum der kardialen Pathophysiologie abgedeckt werden:

1. das Modell der Myokarditis-bedingten dilatativen Kardiomyopathie
2. das Modell der akuten ischämischen Myokardschädigung
3. das Modell der kardialen Hypertrophie

Um ein Modell der dilatativen Kardiomyopathie zu erhalten wurden SWRJ/ (H-2q) Mäuse mit dem Coxsackie-Virus B3 mittels intraperitonealer Injektion infiziert. Dies führt 6 bis 12 Tage nach Infektion zur einer akuten Myokarditis welche danach in eine chronische Phase übergeht (34). Diese persistierende Infektion mit anhaltender chronischer Inflammation des Myokards wird auch in Patienten beobachtet (35). Nach mehreren Wochen entwickeln die Tiere den Phänotyp einer dilatativen Kardiomyopathie. Neue medikamentöse Ansätze welche auf die Unterdrückung der akuten Entzündung abzielen oder den Beginn einer dilatativen Kardiomyopathie verhindern sind hierbei von entscheidender Bedeutung. Dieses Modell bietet dabei eine optimale Studiengrundlage um genau solche Ansätze zu verfolgen und die Effizienz einer Therapie, z.B. anhand der Bestimmung der linksventrikulären Funktionsparameter, zu untersuchen.

Ein sehr gut etabliertes und in der präklinisch-kardiologischen Forschung häufig verwendetes Tiermodell ist das Modell der Okklusion der *left anterior descending* (LAD) *artery* in der Maus zur Induktion eines ischämischen Myokardschadens. Hiermit können sowohl akute (z.B. Apoptose und Inflammation) als auch chronische (z.B. kardiales Remodeling und Narbenbildung) Vorgänge des Infarktes induziert und untersucht werden (36,37). Bei dem etablierten Modell der LAD-Okklusion handelt sich um ein

standardisiertes Operationsverfahren (36,38). Für die Durchführung der LAD-Ligatur wird eine Narkose durch intraperitoneale Injektion von MMF (Medetomidin, Midazolam, Fentanyl) eingeleitet. Nach Fixierung der Tiere auf einer temperaturgesteuerten Wärmeplatte auf dem Rücken werden diese über einen Trachealschnitt intubiert und während der Operation durchgehend ventiliert. Über eine linkslaterale Thorakotomie auf Höhe des 2. Interkostalraumes wird das Herz freigelegt. Das Perikard wird stumpf eröffnet und das schlagende Herz mit Sicht auf die LAD dargestellt. Mit einem dünnen Faden wird die LAD intramyokardial caudal des linken Herzohres umstochen und okkludiert. Anhand des Ablassens des Myokards distal des Punktes der Ligation wird der Erfolg der Okklusion visuell überprüft. Nach erfolgreicher Okklusion wird der Thorax verschlossen, die Maus extubiert und aus der Narkose geweckt. Dieser induzierte Myokardinfarkt führt innerhalb von wenigen Minuten nach der Okklusion der LAD zu einem Rückgang des Kardiomyozytenstoffwechsels und, ohne weitere Therapie, zu einer irreversiblen Schädigung des funktionellen Myokardgewebes (39). Dieses Tiermodell ist optimal dafür geeignet multiparametrische PET-Messungen durchzuführen und die Wertigkeit dieser zu evaluieren. Auch wenn das LAD-Okklusionsmodell nur einen Teil der Realität des klinischen Myokardinfarktes abbildet (insgesamt gesunde Maus mit infarziertem Myokardgewebe vs. multimorbider Patient mit Myokardinfarkt) ermöglicht es durch Auswertung verschiedenster Parameter (z.B. Infarktgröße, Ventrikelvolumina, linksventrikuläre Ejektionsfraktion, funktionelles/vitales Myokardgewebe) in longitudinalen Studien Rückschlüsse auf die Pathophysiologie des ischämischen Myokardschadens. Zudem eignen sich diese Parameter um die Effizienz kardioprotektiver Therapien zu untersuchen.

Um die Pathophysiologie der linksventrikulären Hypertrophie genauer zu untersuchen eignet sich das Mausmodell der druckinduzierten linksventrikulären Hypertrophie nach *Transverse Aortic Constriction* (TAC) (40). Hierfür werden gesunde Mäuse mittels intraperitonealer Gabe von MMF in Narkose versetzt, auf dem Rücken auf einer Temperaturgesteuerten

Wärmeplatte gelagert und an den Extremitäten fixiert. Nach Intubation der Tiere werden diese während der Operation durchgehend mit einem speziellen Mausventilator beatmet. Durch einen medianen Schnitt mit einer Knochenschere durch das Sternum wird der Thorax eröffnet. Nach Mobilisierung und Durchtrennung des Thymus wird der Aortenbogen sichtbar. Zwischen der rechten A. brachiocephalica und der linken Arteria carotis communis wird die Aorta mobilisiert und ein Seidenfaden unter die Aorta gezogen. Vor der Einschnürung wird eine 27G-Kanüle zwischen Aorta und Faden gelegt um weitestgehend eine standardisierte Aortenkonstriktion von 0,4 mm zu erreichen. Nach Knoten des Fadens und erfolgreicher Konstriktion der Aorta wird der Thorax verschlossen, die Maus extubiert und aus der Narkose geweckt. Durch den nun erhöhten Widerstand der Aorta kommt es in diesen Tieren zu einer deutlichen Hypertrophie des linksventrikulären Myokards mit zunehmender Fibrosierung und zunehmenden Zeichen der linksventrikulären Dysfunktion. Auch für dieses Modell eignet sich die EKG-getriggerte FDG-PET ideal zur longitudinalen Untersuchung der Tiere und deren pathophysiologischer Veränderungen.

III. Therapieregime

Das Ziel kardialer Therapien ist es, so früh wie möglich in den Krankheitsprozess einzugreifen, um ein negatives kardiales Remodeling zu verhindern und gleichzeitig die regenerativen Eigenschaften des Herzens zu triggern und zu fördern. Bei der Vielzahl an präklinischen Krankheitsmodellen die aktuell zur Verfügung stehen können vielversprechende, experimentelle Therapien erprobt werden. Da diese präklinischen etablierten Therapien jedoch bei der Anwendung in klinischen Studien nicht immer ein positives Outcome zeigen, ist es wichtig die angewendeten Therapien genauer zu beleuchten und alle zur Verfügung stehenden Parameter bei der Bewertung der Qualität der Therapie und Interpretation der Ergebnisse heranzuziehen.

In präklinischen Studien wurden, sowohl im Modell der ischämischen Kardiomyopathie (41,42) als auch im Modell der autoimmun-induzierten

Myokarditis (43,44), die kardioprotektiven Effekte der Erythropoetin-Therapie beschrieben. Diese kardioprotektiven Eigenschaften wurden insbesondere auf einen anti-apoptotischen Effekt und die vermehrte Freisetzung von Stammzellen aus dem Knochenmark mit Stammzellhoming in das geschädigte Myokard zurückgeführt. Im Rahmen der in dieser Arbeit vorgestellten Studien wurde im Tiermodell der dilatativen Kardiomyopathie das Erythropoetin (EPO) beginnend 8 Wochen nach Induktion der CVB3 Myokarditis über 2 Wochen drei Mal pro Woche subkutan appliziert. Im LAD-Ligatur-Modell erfolgte die EPO-Therapie unmittelbar nach dem Setzen des Myokardinfarktes einmal Täglich über insgesamt 3 Tage.

Bei der sogenannten „dualen Stammzelltherapie“ mittels G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) und Sitagliptin wird versucht in den Mechanismus der Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark und des Stammzellhomings in das Infarktareal medikamentös einzugreifen. Auch hier zeigten präklinische Studien einen deutlichen positiven Effekt (45,46). Durch die Gabe von G-CSF kann die Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark verstärkt werden. Gleichzeitig wird durch Sitagliptin die enzymatische Inaktivierung von SDF1 α (stromal cell-derived factor 1) unterbunden welches eine Schlüsselrolle bei der zielgerichteten Einwanderung von Stammzellen in das Infarktareal spielt. Dadurch können eine höhere Anzahl an Stammzellen in das Infarktareal einwandern. Durch die Therapie sollte ein vermindertes negatives kardiales Remodeling, eine vermehrte Neovaskularisation sowie eine vermehrte Zellproliferation erreicht werden und somit die kardiale Funktion gesteigert und das Überleben verbessert werden. Die Therapie mittels G-CSF (i.p.) und Sitagliptin (p.o.) erfolgte direkt nach erfolgter LAD-Ligatur über insgesamt 6 Tage.

Die Ansätze dieser experimentellen Therapien werden allesamt kontrovers diskutiert. Die beschriebenen positiven Effekte von EPO konnten in ersten klinische Studien nicht nachgewiesen werden (47). Auch die „duale Stammzelltherapie“ konnte das klinische Outcome von Patienten mit einem

akuten Myokardinfarkt nicht verbessern (48). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Notwendigkeit besteht die Effekte dieser Therapien besser zu verstehen und die Relevanz der Ergebnisse besser deuten zu können. Hierfür müssen Bildgebende Verfahren entwickelt und angewendet werden die auf molekularer Ebene diese Therapien repetitiv und longitudinal adäquat überwachen können.

3. Eigene Arbeiten

- I. Retrospektive Bearbeitung der EKG Triggerung von Kleintier PET list-mode Daten
- II. Ableitung eines Atemtriggersignals für die list-mode Kleintier-PET anhand der Atemmodulation des EKG-Signals
- III. Berechnung linksventrikulärer Funktionsparameter bei Mäusen mit ischämischer bzw. dilatativer Kardiomyopathie mittels EKG-getriggelter [68Ga]-Albumin PET im Vergleich zur Magnetresonanztomographie
- IV. Berechnung linksventrikulärer Funktionsparameter bei Mäusen mit ischämischer bzw. dilatativer Kardiomyopathie mittels EKG-getriggelter [18F]FDG-PET: Vergleich mit Magnetresonanztomographie und Monitoring einer Erythropoetin-Therapie
- V. In-vivo Monitoring einer Erythropoetin (EPO) Therapie im Infarktmodell der Maus mittels [68Ga]-Annexin A5 und [18F]-FDG PET
- VI. Evaluierung und Monitoring der „dualen Stammzelltherapie“ mittels G-CSF und Sitagliptin im Infarktmodell der Maus
- VII. Monitoring der linksventrikulären Funktion, Hypertrophie und Narbenlast im Mausmodell der kardialen Hypertrophie mittels [18F]FDG-PET

4. Ergebnisse

Die adäquate Anwendung und Beurteilung von bewegungskorrigierten Datensätzen im Rahmen präklinischer Studien ist eine Grundvoraussetzung zur Gewährleistung valider Messwerte. Die molekulare Bildgebung als nicht-invasive Modalität bietet die Möglichkeit einer repetitiven Evaluierung verschiedenster funktioneller Parameter mit unterschiedlichen Tracern. Diese multiparametrischen Auswertungen ermöglichen eine bessere Interpretation der Ergebnisse, insbesondere im Rahmen von Therapiestudien. Die folgenden Arbeiten beschäftigen sich mit der Etablierung, Anwendung und Evaluierung dieser Werkzeuge im präklinischen Setting. Der Inhalt ist entsprechend dem Exposee wiedergegeben.

I. Retrospektive Bearbeitung der EKG Triggerung von Kleintier PET list-mode Daten

Die physiologische Überwachung von Versuchstieren ist mittlerweile Routine bei der Durchführung von Kleintier-PET-Studien. Mit Hilfe spezieller EKG-Geräte können automatisch Triggersignale erzeugt und in der Bildrekonstruktion zur Ableitung linksventrikulärer Funktionsparameter verwendet werden. Obwohl diese Methode schon länger etabliert ist, kann es dabei, z.B. auf Grund eines mangelhaften EKG Signals bei komplexen experimentellen Bedingungen, zu einer falschen Triggerung kommen. Dies führt zu Bewegungsartefakten und zu falschen Werten bei der Bestimmung der linksventrikulären Funktionsparameter.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden quantitative und visuelle Qualitätskontrollen etabliert mit der die Richtigkeit der EKG-Triggerung überprüft werden kann und zwei Korrekturmechanismen (Filter-basierte Methode oder komplette Neutriggerung) entwickelt. Um die Auswirkungen einer Fehltriggerung zu bewerten wurden die linksventrikulären Funktionsparameter ausgewertet.

Quantitative Qualitätskontrolle:

Gesunde Mäuse sowie Mäuse mit einer dilatativen oder ischämischen Kardiomyopathie (N=30) wurden mittels EKG untersucht und der Mittelwert der Herzfrequenz ($119 \text{ ms} \pm 11,8 \text{ ms}$) und die mittlere Herzfrequenz-Variabilität ($1,7 \text{ ms} \pm 3,4 \text{ ms}$) wurden bestimmt. Diese Standard-Parameterbereiche wurden bei der Erstellung der Qualitätskriterien zur Beurteilung der Triggerung zugrunde gelegt. Daraus konnte eine Gruppe von neun optimal getriggerten (Gruppe 1) und eine Gruppe von acht suboptimale getriggerten (Gruppe 2) [18F]-FDG-PET-Scans von Mäusen aus unserem Archiv ausgewählt werden.

Filter-basierte Korrekturmethode:

Aus den list-mode Dateien der optimal getriggerten Gruppe wurden Trigger zufällig gelöscht (5% bis 60% aller Trigger), um korrupte Dateien zu generieren. Der erstellte Filter basierend auf der mittleren Herzfrequenz und der mittleren Herzfrequenz-Variabilität war in der Lage die korrupten Triggerpunkte zu entfernen und die linksventrikulären Funktionsparameter in der vormals korrupten Gruppe erreichten wieder den Ausgangswert der Gruppe 1.

Komplette Neutriggerung:

PET list-mode Daten (Inveon DPET, Siemens) und das EKG-Signal (BioVet, m2m Imag. Corp.) wurden initial gleichzeitig aufgenommen. Anhand der enthaltenen Triggersignale wurden beide Dateien mittels Minimierungsmethoden synchronisiert. Neue Triggersignale wurden aus dem EKG Signal in der Spitze der R-Zacke Schwellen-basiert ermittelt. Die online generierten Triggersignale wurden aus der list-mode Datei gelöscht und durch die neu ermittelten ersetzt. Um die akkurate Verarbeitung mit der Inveon Software zu gewährleisten wurden die Struktur und das Format der list-mode Datei unverändert gelassen. Um unsere Methode zu evaluieren wurden 2 Gruppen von [18F]-FDG PET Tiermessungen aus unserem Archiv analysiert. Die erste Gruppe (9 Mäuse, BALB/c, $38 \pm 2 \text{ g}$) bestand aus Messungen mit einem guten EKG-Signal und einer guten Onlinetriggerung, in der zweiten Gruppe (8 Mäuse, SWR, $26 \pm 2 \text{ g}$) war die Onlinetriggerung ungenügend (wie bereits oben

beschrieben). Für beide Gruppen wurden neue Triggerpunkte erzeugt und sowohl die ursprünglichen als auch die modifizierten list-mode Datensätze rekonstruiert (3DOSEM/MAP). In der Bildauswertung mit QGS® (Cedars-Sinai) wurden das enddiastolische (EDV), das endsystolische (ESV), das Schlagvolumen (SV) sowie die Ejektionsfraktion (EF) bestimmt.

Ein t-Test für gepaarte Stichproben zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen original und modifiziertem Datensatz in der ersten Gruppe (EDV $p=0,17$; ESV $p=0,59$; SV $p=0,47$; EF $p=0,35$). In der zweiten Gruppe mit ungenügender Qualität der Onlinetriggerung des EKGs konnte nach dem Einfügen neuer Triggerpunkte die Wandbewegungsinformation signifikant verbessert werden (EDV $p<0,05$; ESV $p<0,05$; SV $p<0,05$; EF $p<0,05$). Hierbei stieg das mittlere SV von $17\pm 7\ \mu\text{l}$ auf $27\pm 6\ \mu\text{l}$ und die mittlere EF von $41\pm 16\ \%$ auf $60\pm 13\ \%$ an.

Diese Studie zeigt, dass die offline Reprozessierung des EKG-Signals und die retrospektive Triggerung/Filterung von PET list-mode Daten möglich sind, wenn das komplette EKG-Signal zeitgleich mit den PET list-mode Daten aufgenommen wird. Die quantitative Wandbewegungsanalyse zeigte keine Unterschiede zwischen erfolgreicher Onlineprozessierung und retrospektiver Triggerung/Filterung, jedoch wurden die Resultate im Falle einer ungenügenden Onlinetriggerung durch die retrospektive Triggerung signifikant verbessert.

Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit eine erste Leitlinie erstellt anhand derer Qualität der Triggerung visuell und quantitativ beurteilt werden kann. Zudem wurden Empfehlungen gegeben, wie mit korrupten Daten umgegangen werden sollte.

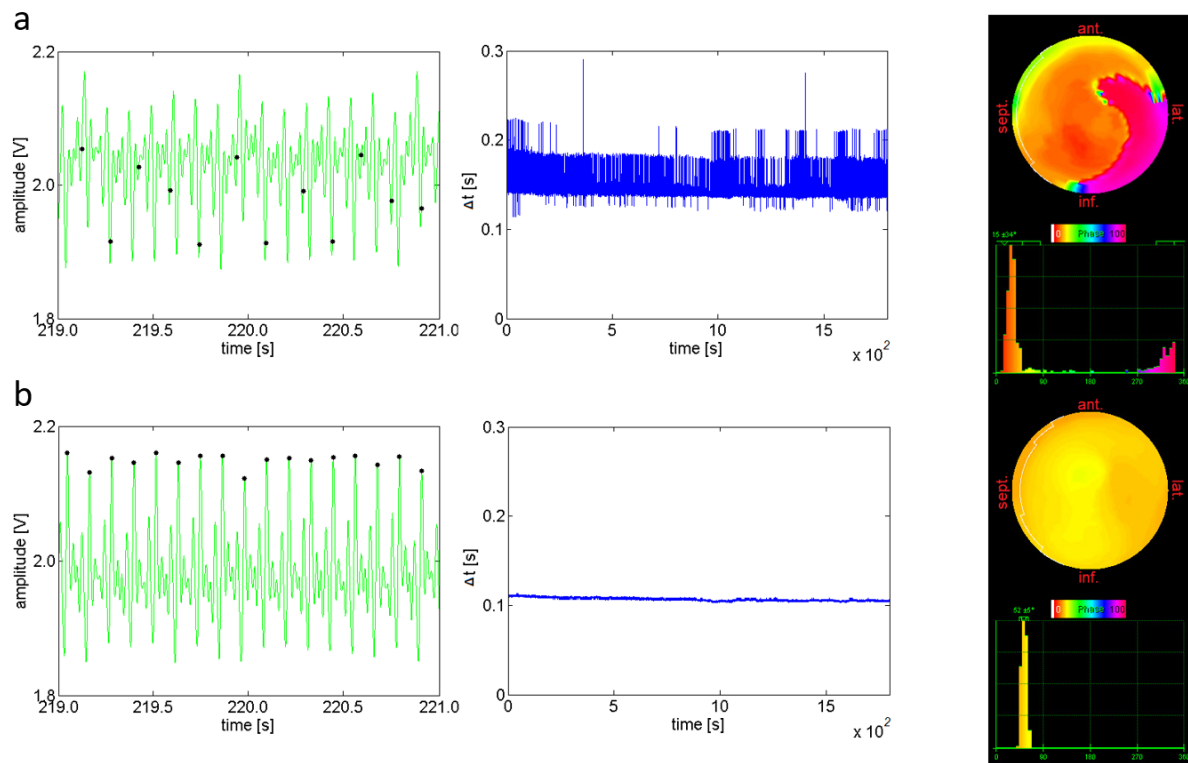


Abbildung 1. Offline Reprozessierung eines korrupten Datensatzes. (a) Der EKG-Ausschnitt (links) zeigt eine suboptimale Triggerung (schwarze Punkte), was auch an der ausgeprägten Variabilität der Herzzykluslänge (Mitte) im originalen Datensatz ersichtlich ist. Die EKG-getriggerte PET-Phasenanalyse der Herzbewegung (rechts) zeigt dabei eine deutliche, artifizielle Dyssynchronie. (b) Nach kompletter Reprozessierung des vormals korrupten Datensatzes zeigt sich ein regelmäßiges Triggersignal im EKG-Ausschnitt (links) und eine physiologische, für Mäuse normale Herzzykluslänge (Mitte) als Hinweis auf die korrekte Triggerung. Die mittels QGS® durchgeführten Phasenanalyse zeigt hier eine synchrone Herzwandbewegung mit einem deutlichen „peak“ im Phasenhistogramm.

(Böning G, Todica A, Vai A, Lehner S, Xiong G, Mille E, Ilhan H, la Fougère C, Bartenstein P, Hacker M. Erroneous cardiac ECG-gated PET list-mode trigger events can be retrospectively identified and replaced by an offline reprocessing approach: first results in rodents. *Phys Med Biol.* 2013; geteilte Erstautorenschaft)

II. Ableitung eines Atemtriggersignals für die list-mode Kleintier-PET anhand der Atemmodulation des EKG-Signals

Die PET list-mode Rohdaten enthalten Bewegungsartefakte die eine Bildunschärfe verursachen können und die räumliche Auflösung verringert. Wenn dies nicht korrigiert wird kann es zur Unterschätzung der Traceraufnahme und Überschätzung der Größe einer kleinen Läsion führen. Zusätzlich können, insbesondere in der Kleintierbildgebung, Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der linksventrikulären Volumina sowie der Ejektionsfraktion auftreten. Die fast immer vorhandene physiologische Überwachung (EKG, Atemmonitoring) der Versuchstiere in der molekularen Kleintierbildgebung kann für eine weitere Prozessierung der Daten, wie z.B. die Rekonstruktion von bewegungskorrigierten Bildern, genutzt werden. Eine wichtige Quelle zur Gewinnung von physiologischen Informationen ist das Elektrokardiogramm (EKG). Des Weiteren kann die Atmung durch die Verwendung von dehnbaren Gurten oder komprimierbaren Kissen aufgezeichnet werden. In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Berechnung von Atemtriggersignalen aus dem EKG und der daraus möglichen retrospektiven Atemtriggerung von PET list-mode Daten entwickelt. Ergänzend wurde die Anwendung der EKG-basierten Methode bei der Bestimmung der linksventrikulären Funktionsparameter (LVF) in Ratten evaluiert.

Gesunde Ratten wurden EKG- und Atemgetriggert nach Injektion von [^{18}F]-FDG mittels microPET über 30 Minuten untersucht. EKG-Triggersignale wurden in der Spitze der R-Zacke bestimmt. Für das Referenz-Atemtriggersignal (RAS) wurde ein komprimierbares Kissen unter dem Thorax der Tiere positioniert. Die RAS wurden anhand der Maxima im Atemkissensignal nach Anwendung eines gleitenden Mittelwertfilters (50 ms) ermittelt.

Basierend auf den ateminduzierten Veränderungen des EKG-Signals durch Absenkung der EKG-Amplitude und Modulation der Herzfrequenz durch die respiratorische Sinusarrhythmie wurde ein EKG-basiertes Atemtriggersignal (EAS) berechnet. Die PET-Datensätze wurden nur EKG-getriggert (12 Frames;

Gruppe 1) oder EKG- und atemgetriggert (RAS; Gruppe 2 / EAS; Gruppe 3) rekonstruiert (12 Frames bzw. 3 Frames) und die LVF ausgewertet.

Die mittlere RAS-Dauer betrug 1120 ± 159 ms. Es konnte kein Unterschied zur mittleren EAS-Dauer (1120 ± 159 ms) beobachtet werden ($P=n.s.$). Ein direkter Vergleich jeder einzelnen RAS- und EAS-Dauer zeigte ein erhöhtes Rauschen (66 ± 22 ms vs 51 ± 29 ms; $P < 0,001$), bedingt durch die verminderte Abtastrate im EAS (definiert durch die EKG-Triggerpunkte). Linksventrikuläre Volumina (EDV, ESV, SV) waren signifikant höher ($P < 0.001$) nach Korrektur der Atembewegung in der RAS- (387 ± 56 μ l; 162 ± 34 μ l; 225 ± 27 μ l) und der EAS-Gruppe (389 ± 59 μ l; 163 ± 35 ; 226 ± 29 μ l) verglichen mit der Gruppe ohne Korrektur der Atembewegung (367 ± 59 μ l; 153 ± 35 μ l; 214 ± 27 μ l). Die RAS- und EAS-Gruppe zeigten ähnliche Werte für EDV, ESV und SV ($P=n.s.$). Die Atembewegung hatte keinen Einfluss auf die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die neue, alleine auf dem EKG-basierende Methode zur Korrektur von Atemartefakten mit vergleichbarer Genauigkeit wie die Referenzmethode mittels Atemkissen bei deutlich reduziertem Messaufwand funktioniert. Die Anwendung der Atemkorrektur bei der Bestimmung der LV Pumpfunktion verbessert die Endokarddelineation und führt dadurch zu höheren Volumina ohne sich jedoch signifikant auf die EF auszuwirken.

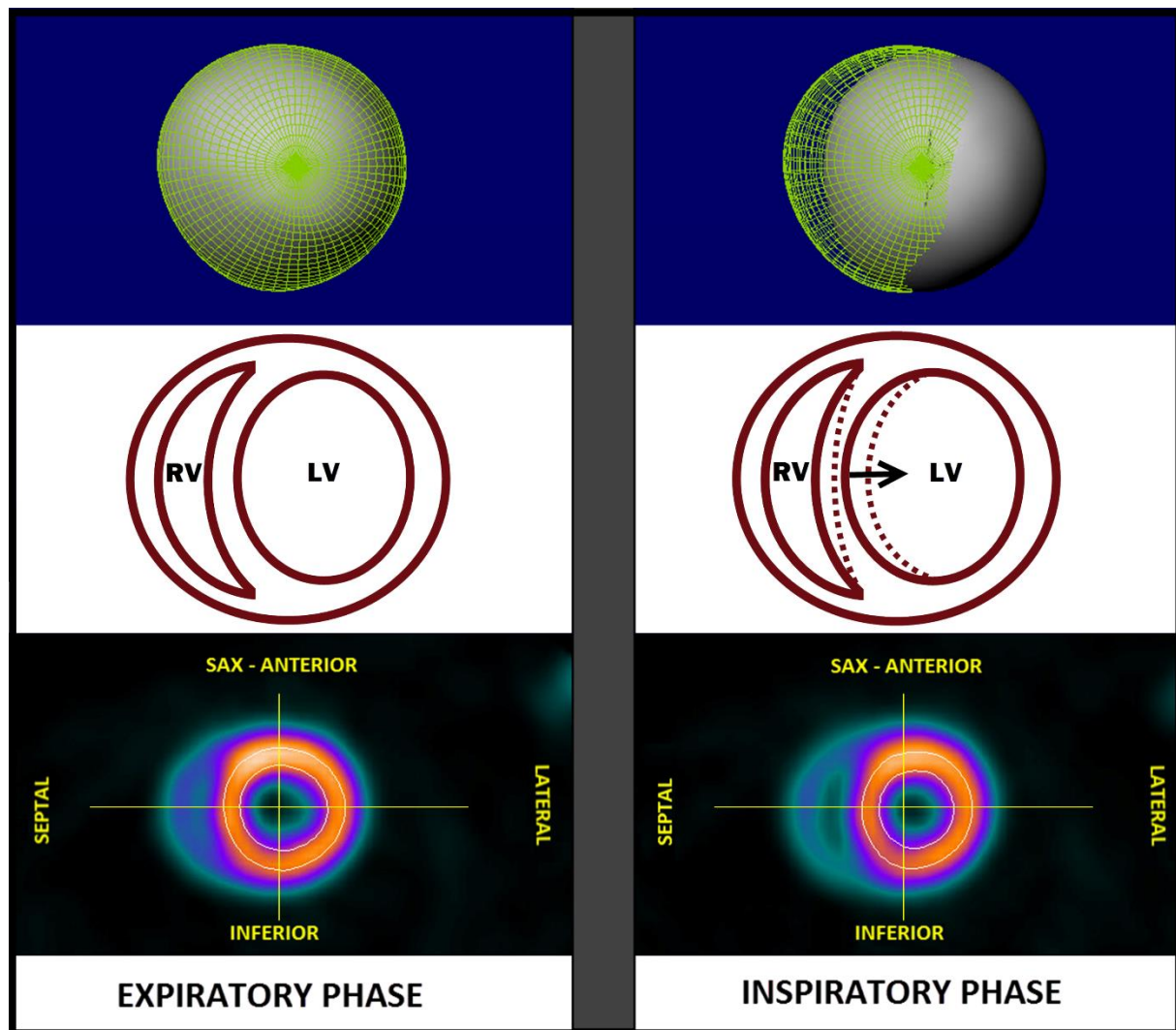


Abbildung 2. Einfluss der Atmung auf die Herzbewegung. Bewegung des Herzens zwischen Expiration (links) und Inspiration (rechts). Die Änderung des intrathorakalen Druckes während der Inspiration führt zu einem erhöhten Blutzufuss in den rechten Ventrikel, welcher zu einer transienten Verschiebung des Septums und dadurch zu einer Modulation des linksventrikulären Füllvolumens führt. (die obere Zeile zeigt die epikardiale Wand in QGS 2008 ®; die mittlere Zeile illustriert die Septumdeviation während der Atmung; die untere Zeile stellt die Kurzachsenschnitte mit epi- und endokardialen Konturen in QGS® dar.

(Todica A, Lehner S, Wang H, Zacherl MJ, Nekolla K, Mille E, Xiong G, Bartenstein P, la Fougère C, Hacker M, Böning G. Derivation of a respiration trigger signal in small animal list-mode PET based on respiration-induced variations of the ECG signal. *J Nucl Cardiol.* 2015)

III. Berechnung linksventrikulärer Funktionsparameter bei Mäusen mit ischämischer bzw. dilatativer Kardiomyopathie mittels EKG-getriggter [68Ga]-Albumin PET im Vergleich zur Magnetresonanztomographie

Das Ziel dieser Arbeit war die Evaluierung und Bestimmung linksventrikulärer Funktionsparameter bei Mäusen mit ischämischer und dilatativer Kardiomyopathie sowie in Kontrolltieren mit dem neuartigen Blut-Pool-Tracer [68Ga]-Albumin und der Vergleich zum Referenzstandard MRT.

C57BL/6 Mäuse, bei denen durch Ligatur der Ramus interventricularis anterior ein Infarkt induziert wurde (ICM), wurden nach 4 Wochen mittels PET und MRT untersucht. SWR/J (H-2q)-Mäuse wurden mit Coxsackievirus B3 infiziert und entwickelten nach einer chronischen Phase eine dilatative Kardiomyopathie (DCM). Die DCM Tiere wurden ca. 12 Wochen nach Infektion mittels PET und MRT untersucht. Gesunde SWR/J (H-2q) Mäuse dienten als Kontrolle (GK). Die EKG-getriggerte Blutpool PET Untersuchung erfolgte über 30 min nach Injektion von 13 ± 3 MBq [68Ga]-Albumin. Die linksventrikulären Funktionsparameter wurden für Ga-68-Albumin-PET mittels QBS-Software (Cedars Sinai, LA, USA) berechnet. Referenzstandard-Messungen wurden auf einem klinischen 1,5 T MRT durchgeführt und mittels Munich Heart® Software (Klinikum RDI) ausgewertet.

Es ergaben sich folgende Mittelwerte und Korrelationen verglichen mit dem Referenzstandard für EDV, ESV und EF in der gemischten Gruppe aus GK sowie ICM und DCM Tieren: MRT: $125 \pm 80 \mu\text{l}$, $96 \pm 77 \mu\text{l}$, $33 \pm 21\%$; Ga-68-Albumin PET: $181 \pm 86 \mu\text{l}$ ($R=0,98$), $136 \pm 92 \mu\text{l}$ ($R=0,99$), $31 \pm 16\%$ ($R=0,99$). Im Vergleich zur MRT wurden die Volumina durch [68Ga]-Albumin PET überschätzt, jedoch ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der EF. Es zeigten sich insgesamt sehr gute Korrelationen zwischen PET und MRT.

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit der neue Tracer [68Ga]-Albumin als Blutpooltracer im Mausmodell evaluiert und etabliert werden. Der große Vorteil der [68Ga]-Albumin-PET zeigt sich v.a. im ICM Modell. Im Gegensatz zu [18F]-FDG, welches auf Grund der Myokardavitalität im Infarktareal nicht mehr ausreichend angereichert werden kann, besteht bei [68Ga]-Albumin keine

Einschränkung der Endokarddelineation. Insbesondere bei seriellen Messungen im Modell der ICM, bei der es zu einer zunehmenden Dilatation der Infarkt Narbe kommen kann, ermöglicht diese Technik ein weitaus genaueres Therapiemonitoring der linksventrikulären Funktionsparameter.

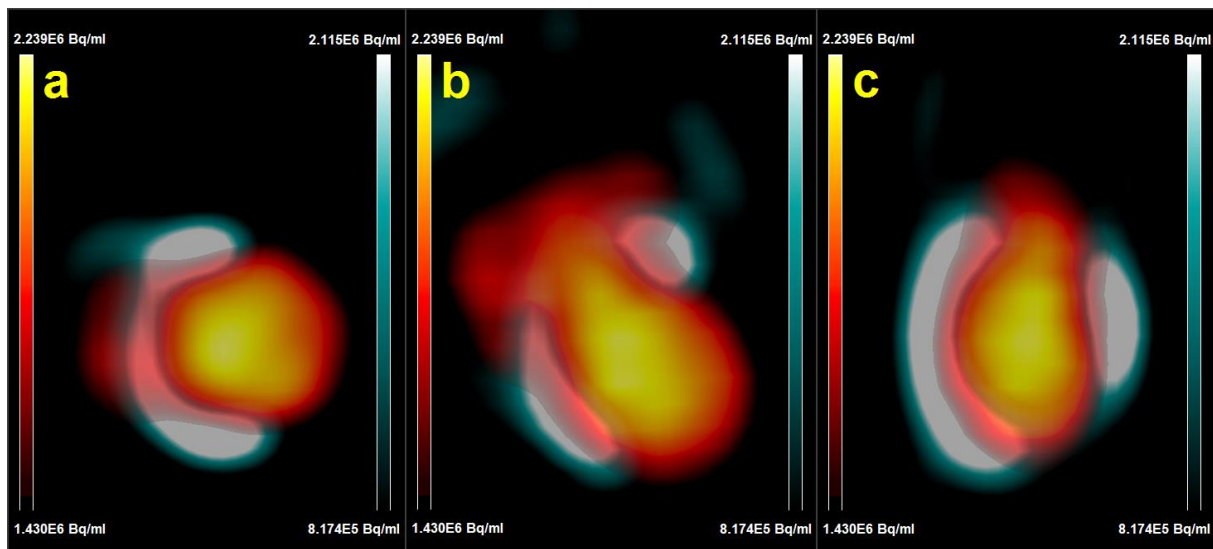


Abbildung 3. Visualisierung der komplementären Information aus Blutpool-PET und Myokardanreicherung in einem ICM-Tier. Statische Bildfusion aus $[^{68}\text{Ga}]$ -Albumin-Blutpool-PET und $[^{18}\text{F}]$ -FDG-Myokard-PET in einem Infarkt Tier in axialer (a), koronarer (b) und sagittaler Schichtführung. Die fehlende $[^{18}\text{F}]$ -FDG-Anreicherung im Narbengewebe kann leicht zu einer falschen Konturerkennung führen, insbesondere bei Tieren mit älteren Infarkten, bei denen die Herzen mit zunehmender Zeit dilatieren.

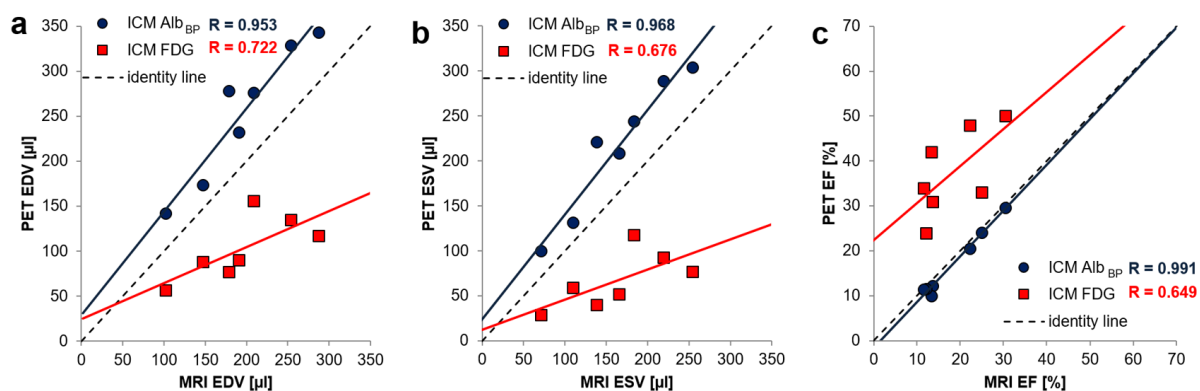


Abbildung 4. Linksventrikuläre Funktionsparameter aus MRT (Referenzstandard) und PET in ICM-Tieren. Es zeigt sich eine deutlich bessere Korrelation zwischen Albumin-PET und MRT als zwischen FDG-PET und MRT sowohl für das

enddiastolische (EDV; a) und das endsystolische Volumen (ESV; b) als auch für die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF; b) in Tieren mit einer ICM. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, wie in Abbildung 3 dargestellt, die fehlende Anreicherung im Narbenareal. Dies kann zu einer falschen Delineation des Endokards führen und hierdurch zur Unterschätzung des tatsächlichen Herzbinnenraumvolumens. Konsekutiv kommt es zu einer Überschätzung der linksventrikulären EF (vgl. Abb. 4 c).

(Todica A, Brunner S, Böning G, Lehner S, Nekolla SG, Wildgruber M, Ubleis C, Wängler C, Sauter M, Klingel K, Cumming P, Bartenstein P, Schirmacher R, Franz WM, Hacker M. [(68)Ga]-Albumin-PET in the Monitoring of Left Ventricular Function in Murine Models of Ischemic and Dilated Cardiomyopathy: Comparison with Cardiac MRI. Mol Imaging Biol. 2013)

IV. Berechnung linksventrikulärer Funktionsparameter bei Mäusen mit ischämischer bzw. dilatativer Kardiomyopathie mittels EKG-getriggelter [18F]FDG-PET: Vergleich mit Magnetresonanztomographie und Monitoring einer Erythropoetin-Therapie

Ziel dieser Arbeit war die Evaluierung der nicht-invasiven, EKG-getriggerten [18F]-FDG-PET für serielle Messungen der linksventrikulären Volumina und Ejektionsfraktion in Mäusen mit ischämischer (ICM) und dilatativer (DCM) Kardiomyopathie sowie in gesunden Kontrolltieren. Als Validierungsstudie wurden die Effekte einer Erythropoietin (EPO) Behandlung auf DCM-Mäuse untersucht.

Mäuse entwickelten eine dilatative Kardiomyopathie ca. 8 Wochen nach Infektion mit Coxsackievirus B3 (CVB3), während die ischämische Kardiomyopathie durch Ligation der LAD (left anterior descending artery) induziert wurde. Die linksventrikulären Volumina (EDV und ESV) und Ejektionsfraktion (LVEF) von DCM, ICM und gesunden Kontrollmäusen wurden mittels EKG-getriggelter [18F]-FDG-PET gemessen und mit Ergebnissen des Referenzstandards MRT verglichen. In der anschließenden

Therapiemonitoringstudie in DCM-Mäusen wurde als Baselineuntersuchung (8 Wochen nach Infektion) und nach 4-wöchiger Behandlung mit EPO oder Kochsalzlösung (8 Wochen nach Infektion) die LVEF mittels EKG-getriggelter [18F]-FDG-PET ausgewertet.

Die mittels EKG-getriggelter [18F]-FDG-PET gemessenen LV Volumina und die LVEF korrelierten signifikant mit den MRT-Ergebnissen. Die Korrelation war höher bei gesunden Mäusen und Mäusen mit DCM verglichen mit den Tieren mit ICM. Die schlechtere Korrelation bei den Infarkttieren ist am ehesten bedingt durch die fehlende [18F]-FDG Anreicherung im Infarktareal und die dadurch eingeschränkte Endokarddelineation. LV Volumina (EDV und ESV) wurden systematisch durch die PET unterschätzt was zu einer konsekutiven Überschätzung der LVEF führte. In unserer Therapiemonitoringstudie zeigte sich eine signifikante Abnahme der LVEF in der EPO-Therapiegruppe wobei die LVEF der Placebo-Gruppe unverändert blieb. Eine mögliche Erklärung für die Verschlechterung der Pumpfunktion ist die Erhöhung der Blutviskosität durch die EPO-Therapie was zu einer Mehrarbeit für das Herz geführt haben könnte.

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass die mittels EKG-getriggelter [18F]-FDG-PET gemessene LVEF eine hohe Korrelation zum Referenzstandard MRT aufwies wobei sie systematisch von der PET überschätzt wurde. Trotz dieser Limitation konnte gezeigt werden, dass die [18F]-FDG-PET zur Untersuchung der EPO-Therapieeffekte auf die kardiale Pumpfunktion in Mäusen mit Virus-induzierter dilatativer Kardiomyopathie verwendet werden kann.

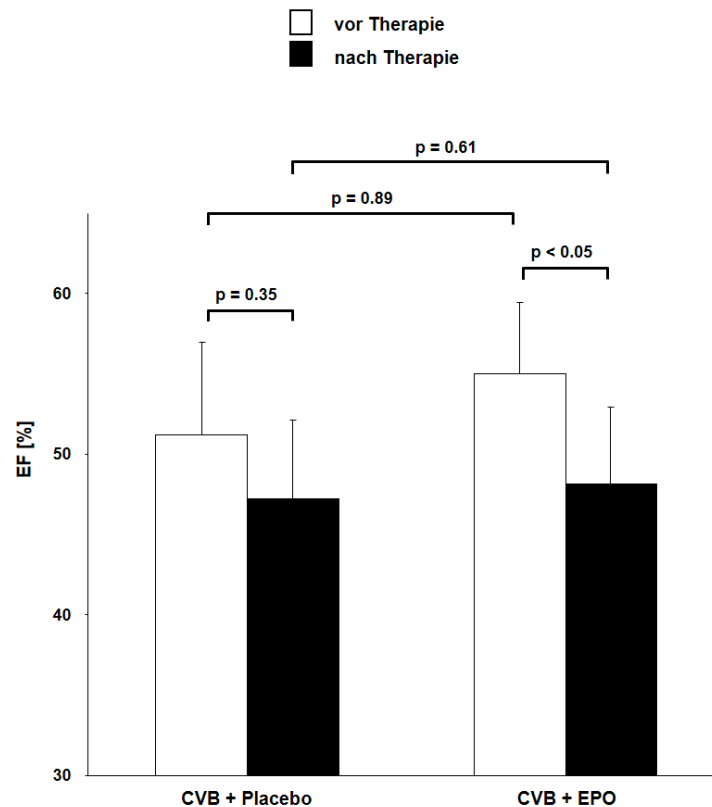


Abbildung 5. Einfluss der Erythropoetin-Therapie auf die linksventrikuläre Ejektionsfraktion. Diese Abbildung zeigt die longitudinal, mittels EKG-getriggter FDG-PET bestimmte linksventrikuläre Ejektionsfraktion in Tieren mit einer dilatativen Kardiomyopathie. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der EF vor und nach Therapie in der Placebo-Gruppe. Im Gegensatz hierzu zeigte sich ein signifikanter Abfall der linksventrikulären EF nach zweiwöchiger Therapie mit Erythropoetin. Dieser scheinbar negative Effekt auf die linksventrikuläre EF mag zum Teil durch eine zunehmende Erhöhung der Blutviskosität und einer damit einhergehenden, erhöhten Mehrarbeit des Herzens verursacht sein.

(Brunner S, Todica A, Böning G, Nekolla SG, Wildgruber M, Lehner S, Sauter M, Ubleis C, Klingel K, Cumming P, Franz WM, Hacker M. Left ventricular functional assessment in murine models of ischemic and dilated cardiomyopathy using [18F]FDG-PET: comparison with cardiac MRI and monitoring erythropoietin therapy. EJNMMI Res. 2012; geteilte Erstautorenschaft)

V. In-vivo Monitoring einer Erythropoetin (EPO) Therapie im Infarktmodell der Maus mittels [68Ga]-Annexin A5 und [18F]-FDG PET

Analog zur vorhergehenden Arbeit war das Ziel dieser Studie die potentielle kardioprotektive Wirkung von Erythropetin (EPO) zu untersuchen anhand der frühen Expression des Apoptosemarkers Phosphatidylserin sowie der linksventrikulären Volumina und der Ejektionsfraktion. Dadurch sollte ein tieferer Einblick in die Modulation der Pathomechanismen auf zellulärer Ebene gewonnen werden.

In C57BL/6 Mäusen wurde operativ ein Myokardinfarkt induziert. Die Tiere wurden randomisiert und entweder dem Therapiearm (3000 IE/kg EPO am OP-Tag, 1000 IE/kg EPO am Tag 1 und 2 nach der OP) oder dem Placeboarm (Injektion von 0,9% Kochsalzlösung an den entsprechenden Tagen) zugeordnet. Zur Visualisierung und Quantifizierung der Apoptose (Phosphatidylserin-Expression) wurde an Tag 2 nach Myokardinfarkt eine [68Ga]-Annexin-PET durchgeführt und der %ID/g des Annexin-Uptakes im Infarktareal sowie im gesunden Myokard ermittelt. Zur Bestimmung der Infarktgröße und der linksventrikulären Funktionsparameter (linksventrikuläre Ejektionsfraktion, Schlagvolumen, enddiastolisches und endsystolisches Volumen) wurde an den Tagen 6 und 30 nach Myokardinfarkt eine EKG-getriggerte [18F]-FDG-PET Messung durchgeführt.

Es zeigte sich insgesamt ein signifikant höherer Annexin-Uptake im Infarktareal als in dem gesunden Myokard, jedoch hatte die EPO-Therapie kein Einfluss auf den Annexin-Uptake an Tag 2. Hinsichtlich der Infarktgröße zeigten sich eine geringe Verkleinerung nach EPO-Therapie und eine tendenzielle Zunahme in der Placebogruppe, jedoch beides statistisch nicht signifikant. Bezüglich der linksventrikulären Funktionsparameter zeigten sich in der Kontrollgruppe im zeitlichen Verlauf keine signifikante Veränderung der Funktionsparameter. Hingegen kam es in der EPO-Gruppe im Verlauf zu einer signifikanten Zunahme des EDV, des ESV sowie des SV, wobei die LVEF im Verlauf unverändert blieb.

Die kardioprotektive Wirkung von EPO wird in der Literatur durchaus kontrovers diskutiert, und wie in der vorangegangenen Studie bereits suspiziert wurde

könnten zum Teil sogar herzscheidende Effekte auftreten. Kardioprotektive Effekte, wie die Induktion der Stammzelleinwanderung, die Neoangiogenese und der positive Effekt auf die Apoptoserate, stehen negativen Effekten gegenüber, wie der EPO-induzierten Hypertonie, der Polyzythämie und der erhöhten Blutviskosität. In der aktuellen Studie kam es möglicherweise dazu, dass die nachteiligen EPO Wirkungen die kardioprotektiven Effekte überwiegen. Die Dilatation des Herzens führten wir z.B. auf eine EPO-induzierte Zunahme der Blutviskosität mit einer Erhöhung der myokardialen Nachlast zurück. Das zeigt, dass mögliche Therapieregime optimiert werden müssen und ein multimodales bzw. multiparametrisches Therapiemonitoring zur genauen Beurteilung der einzelnen Therapiewirkungen unerlässlich ist.

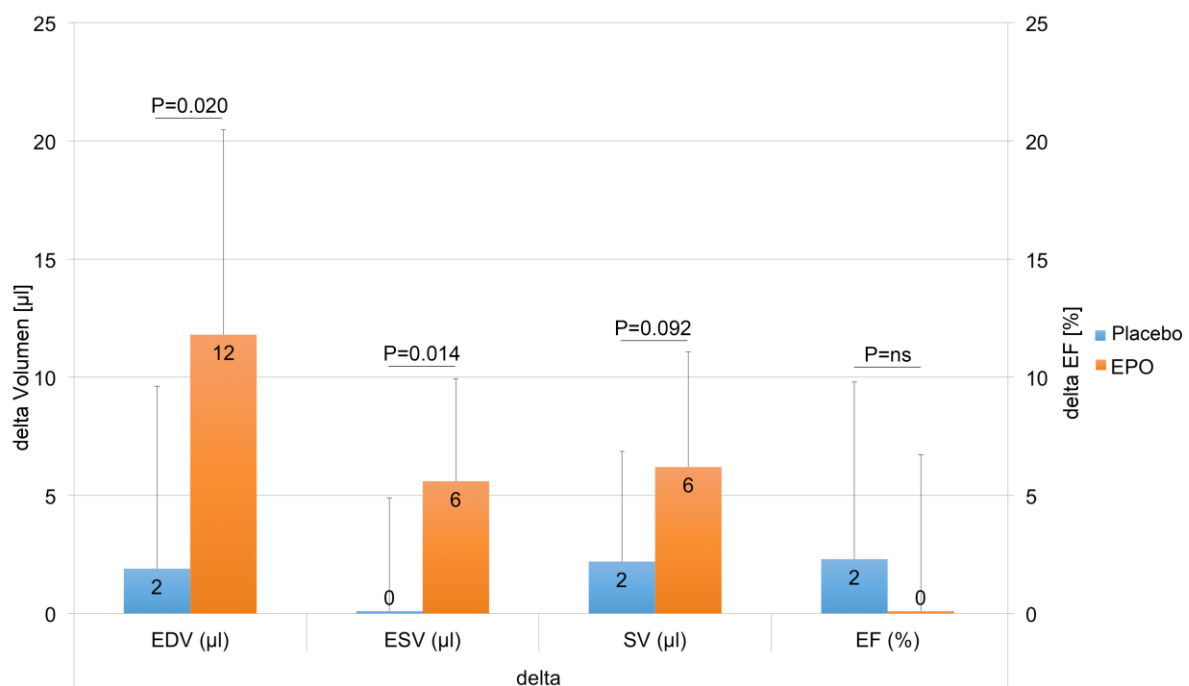


Abbildung 6. Vergleich der Veränderung (delta) von EDV, ES, SV und EF zwischen Tag 6 und Tag 30 in der Kontrollgruppe und der EPO-Gruppe. In der EPO-Gruppe zeigte sich eine signifikant stärkere Zunahme der linksventrikulären Volumina (EDV, ESV und SV) bei weitgehend vergleichbarer linksventrikulärer Ejektionsfraktion. Hier zeigt sich möglicherweise der negative Effekt der EPO-Therapie, welcher zu einer Steigerung der Blutviskosität und dadurch zu einer Erhöhung der Nachlast führen kann. Die Zunahme des EDV und ESV in der EPO-

Gruppe können unter anderem als Zeichen des kardialen Remodelings gewertet werden. Die kardiale Mehrarbeit wurde jedoch durch Zunahme des Schlagvolumens und hierunter stabiler LVEF kompensiert. Dies mag unter anderem ein Grund dafür sein, dass klinische Studien mit EPO zu einem negativen Ergebnis geführt haben.

(Todica A, Zacherl M, Wang H, Böning G, Jansen NL, Wängler C, Bartenstein P, Kreissl MC, Hacker M, Brunner S, Lehner S. In-vivo Monitoring of Erythropoietin Treatment after Myocardial Infarction in Mice with [68Ga]Annexin A5 and [18F]FDG PET. J Nucl Cardiol. 2014)

VI. Evaluierung und Monitoring der „dualen Stammzelltherapie“ mittels G-CSF und Sitagliptin im Infarktmodell der Maus

Im Rahmen dieser Studie wurde die Wirkung der „dualen Stammzelltherapie“ mittels G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) und Sitagliptin im Infarktmodell der Maus durch [18F]-FDG-PET untersucht. G-CSF führt zu einer vermehrten Mobilisierung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (bone marrow-derived progenitor cells; BMPCs). Sitagliptin führt zu einer verbesserten myokardialen Rekrutierung von BMPCs durch pharmakologische Hemmung der Dipeptidylpeptidase-IV und somit zur Stabilisierung der SDF-1 α /CXCR4-Achse. Ziel ist dabei die Verminderung des kardialen Remodelings, Erhöhung der kardialen Zellproliferation sowie eine Reduktion des Infarktareals durch Induktion einer Stammzelleinwanderung aus dem Knochenmark. Die funktionelle [18F]-FDG-PET bietet hierbei die Möglichkeit des seriellen und nicht invasiven Therapiemonitorings.

Durch permanente LAD-Ligation erfolgte die Infarktinduktion in C57BL/6 Mäusen. Die Therapiegruppe wurde mit Sitagliptin p.o. und G-CSF i.p. (duale Stammzelltherapie) von Tag 0-5 therapiert. Die Placebo-Gruppe erhielt NaCl i.p. nach dem gleichen Schema. An Tag 6 und 30 erfolgte 30 min. nach Applikation von [18F]-FDG eine EKG-getriggerte microPET Messung. Die %ID im Herzen, sowie das metabolische Herzvolumen wurden thresholdbasiert

ermittelt. Der Stoffwechseldefekt wurde mittels QPS (Cedars Sinai, LA, USA) bestimmt.

In der Placebo-Gruppe war die %ID an Tag 6 signifikant höher als in der Therapiegruppe mit Normalisierung an Tag 30. Die reduzierte Stoffwechselaktivität im Remote-Myokard in der Therapiegruppe könnte als antiinflammatorischer Effekt nach akutem Myokardinfarkt gewertet werden. Diese Hypothese wird auch durch die durchgeführte Durchflusszytometrie untermauert, bei der eine signifikante Erhöhung der entzündungshemmenden M2-Makrophagen-Subpopulation in den Herzen der behandelten Tiere nachgewiesen werden konnte. In der nicht-therapierten Gruppe kam es zu einer signifikant höheren Zunahme des metabolischen Herzvolumens und einer Dilatation des linken Ventrikels, verglichen mit der Therapiegruppe. Diese Veränderung zeigt die vorteilhafte Wirkung der dualen Stammzelltherapie auf das kardiale Remodeling. Darüber hinaus kam es in der Therapiegruppe im Verlauf zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße, wohingegen der Defekt in der Placebo-Gruppe eine tendenzielle Zunahme aufwies.

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass die Zielvariablen Traceruptake, metabolisches Wandvolumen und Infarktgröße mittels [18F]-FDG-PET seriell und nichtinvasiv ermittelt werden können. Die duale Stammzelltherapie mit G-CSF und Sitagliptin zeigte einen positiven Effekt auf das kardiale Remodeling durch Reduktion der entzündlichen Aktivität, Verminderung der kardialen Arbeitslast und Reduktion des Infarktareales.

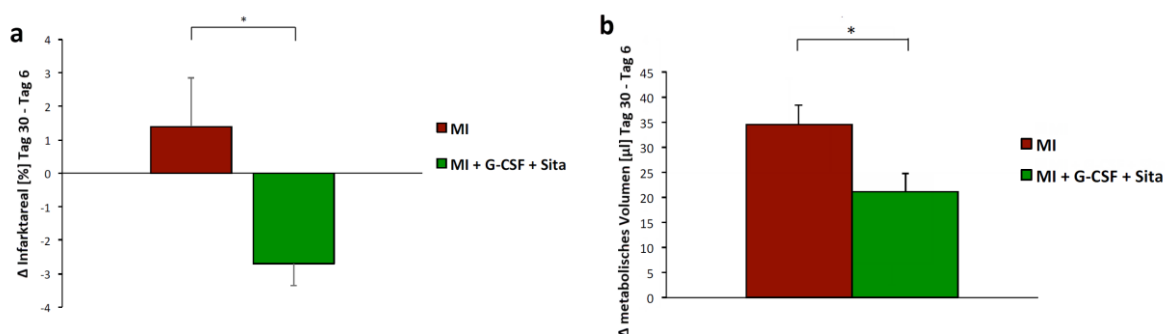


Abbildung 7. Vergleich der Veränderung (delta) von Infarktareal und metabolischem Volumen von Tag 6 auf Tag 30 in der Kontrollgruppe und der Therapie Gruppe. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme des Infarktareales in

der Therapiegruppe, wohingegen der Stoffwechseldefekt in der Placebo-Gruppe tendenziell eher zunahm. Die Veränderung des Infarktareals (a) zeigte sich somit signifikant unterschiedlich zwischen beiden Gruppen (* $p < 0,05$). Auch das metabolische Volumen (b) stieg signifikant stärker an im Verlauf in der Placebo-Gruppe verglichen mit der therapierten Gruppe (* $p < 0,05$). Die geringere Hypertrophie des Myokards in der Therapie-Gruppe ist möglicherweise durch reduziertes negatives Remodeling nach Infarkt zu erklären.

(Gross L, Paintmayer L, Lehner S, Brandl L, Brenner C, Grabmaier U, Huber B, Bartenstein P, Theiss HD, Franz WM, Massberg S, Todica A, Brunner S. FDG-PET reveals improved cardiac regeneration and attenuated adverse remodeling following Sitagliptin + G-CSF therapy after acute myocardial infarction. Eur Heart J Cardiovasc Imaging; geteilte Letztautorenschaft)

VII. Monitoring der linksventrikulären Funktion, Hypertrophie und Narbenlast im Mausmodell der kardialen Hypertrophie mittels [18F]FDG-PET

Ziel dieser Studie war die [18F]-FDG-PET-basierte Analyse linksventrikulärer Funktionsparameter, Hypertrophie und der Narbenlast in einem Modell der murinen kardialen Hypertrophie im zeitlichen Verlauf, zur Etablierung der [18F]-FDG-PET als Bildgebungsmodalität in diesem Modell.

Bei C57BL/6 Mäusen wurde durch *Transverse Aortic Constriction* (TAC) eine Druckbelastung induziert, wodurch sich nach 2-4 Wochen eine ausgeprägte kardiale Hypertrophie entwickelte. Die Tiere wurden seriell 4 und 8 Wochen post-OP mittels nicht-invasiver EKG-getriggelter [18F]-FDG-PET untersucht. Anschließend wurden die Herzen entnommen, gewogen und für die Quantifizierung der PET histologisch auf Fibrose untersucht. Bei einer Subgruppe von 10 Tieren erfolgte die Entnahme bereits nach dem ersten Scan. Die Parameter enddiastolisches Volumen (EDV μ l) und linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF %) wurden mittels QGS®, die Narbenlast mittels QPS® sowie das metabolische Volumen (MV) mittels Inveon Research Workplace (IRW®) berechnet.

Insgesamt zeigte sich eine sehr hohe Korrelation zwischen dem MV und dem Gewicht des Herzens. Im zeitlichen Verlauf von 4-8 Wochen zeigten sich eine signifikante Zunahme des EDV und MV sowie ein Abfall der LVEF. Dies kann als Zeichen des pathologischen kardialen Remodelings mit Dilatation des Ventrikels und Hypertrophie des Myokards angesehen werden was zu einer Verschlechterung der linksventrikulären Pumpfunktion geführt hat. Die Zunahme des enddiastolischen Volumens (Δ EDV) sowie des metabolischen Volumens (Δ MW) zeigte eine hohe positive Korrelation mit der Fibrose nach 8 Wochen. Darüber hinaus zeigte sich eine tendenzielle Zunahme der Stoffwechseldefekte innerhalb von 4 Wochen was jedoch nur mäßig mit dem Fibrosevolumen korrelierte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die [18F]-FDG-PET zum seriellen in-vivo Monitoring der linksventrikulären Veränderungen im Modell der murinen kardialen Hypertrophie sehr gut geeignet ist. Die Dilatation des linken Ventrikels, die myokardiale Hypertrophie, der Abfall der LVEF sowie die Entstehung umschriebener myokardialer Narben konnten zuverlässig im Verlauf dargestellt und quantifiziert werden. Die Volumenzunahme des Ventrikels und des Myokards im Verlauf ist prädiktiv für eine hohe Fibroselast.

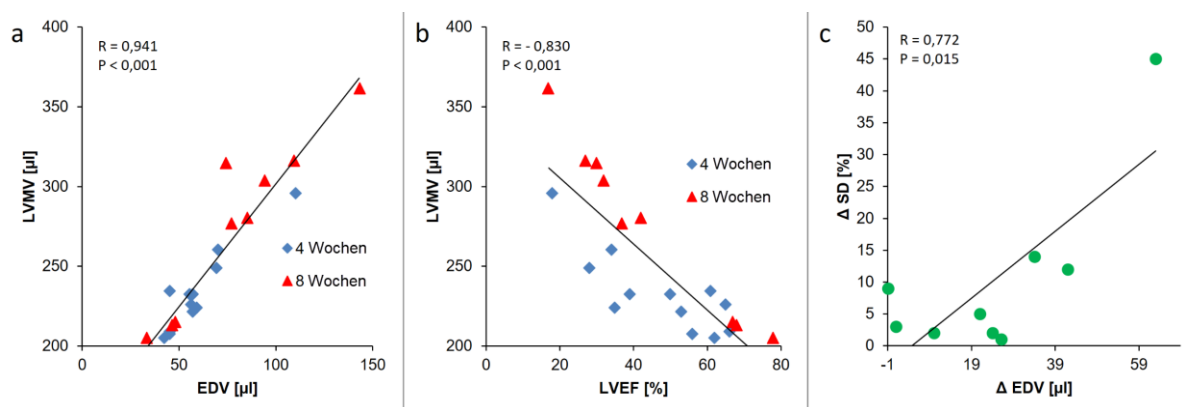


Abbildung 8. Indirekte Zeichen des kardialen Remodelings. Das linksventrikuläre metabolische Volumen (LVMV) zeigte eine hohe positive Korrelation zum enddiastolischen Volumen (EDV a) sowie eine signifikante negative Korrelation zur linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF; b). Hierbei zeigt sich, dass der Krankheitsprogress mit einer zunehmenden diastolischen Dysfunktion einhergeht und bei weitgehend unverändertem Schlagvolumen

im Verlauf auch zu einem signifikanten Abfall der LVEF führt. Zudem war die Zunahme des EDV in der seriell gemessenen Gruppe mit einer Zunahme der Stoffwechseldefekte assoziiert (c). Studien lassen hierbei vermuten, dass strukturelle Veränderungen, wie die eingeschränkte vasodilatatorische Kapazität auf Grund des teils intramuralen Verlaufes der Coronararterien, zu rezidivierenden Ischämien führen können. Dies ist möglicherweise eine Erklärung für Zunahme der Stoffwechseldefekte welche wiederum ihrerseits die zunehmende Dilatation des linken Ventrikels im Krankheitsverlauf begünstigen können. All diese Faktoren können als indirekte Zeichen des kardialen Remodelings gewertet werden.

(Todica A, Beetz L, Günther L, Zacherl MJ, Paintmayer L, Grabmaier U, Huber B, Massberg S, Bartenstein P, Brunner S, Lehner S. Monitoring of Cardiac Remodeling in a Mouse Model of Pressure-Overload Left Ventricular Hypertrophy with [18F]FDG MicroPET; Mol Imaging Biol. 2017)

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Habilitationsprojektes konnten folgende Ziele erreicht werden:

Es wurden Methoden zur Überprüfung, Triggerung und Nachbearbeitung bewegungskorrigierter Aufnahmen entwickelt. Diese bilden das Fundament aller bisher durchgeführten und aller zukünftigen präklinischen Studien, bei denen eine akkurate Bestimmung linksventrikulärer Funktionsparameter notwendig ist.

Ohne die Möglichkeit, die Qualität der Daten zu überprüfen, besteht die hohe Gefahr, auf Grund fehlerhafter Werte, falsche Schlussfolgerungen zu ziehen. Zudem wurde die Option geschaffen, falsche Datensätze nachzubearbeiten, um Wiederholungen von Messungen und dadurch unnötige Tierversuche zu vermeiden.

Darüber hinaus konnten im Rahmen des Habilitationsprojektes ein neuer Radiotracer zur Bestimmung der linksventrikulären Pumpfunktion etabliert ([⁶⁸Ga]-Albumin) und ein neuartiger PET-Tracer zur Darstellung des Zelluntergangs im Herzen ([⁶⁸Ga]-Annexin) hinsichtlich des Therapiemonitorings und der Prognoseabschätzung evaluiert werden.

Der größte Fokus, welcher sich in fast allen vorgestellten Publikationen wiederfindet, lag jedoch in der konsequenten Evaluierung, Etablierung und Weiterentwicklung der EKG-getriggerten [¹⁸F]-FDG-PET als multiparametrisches Verfahren zum Therapiemonitoring. Hierbei fand die Methode ihre Anwendung bei der Bestimmung der myokardialen Vitalität bzw. der Infarktgröße sowie bei der Abschätzung der Entzündungsaktivität im Remote-Myokard. Zudem wurde sie bei der Beurteilung pathologischer Remodelingvorgänge eingesetzt durch die Evaluierung der Ventrikeldilatation sowie der Hypertrophie anhand des metabolischen linksventrikulären Volumens und der Bestimmung linksventrikulärer Funktionsparameter (EDV, ESV, SV und LVEF).

6. Literaturverzeichnis

1. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Heart disease and stroke statistics-2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129:e28-e292.
2. Rischpler C, Nekolla S, Schwaiger M. PET and SPECT in heart failure. *Curr Cardiol Rep*. 2013;15:337.
3. Brunner S, Todica A, Boning G, et al. Left ventricular functional assessment in murine models of ischemic and dilated cardiomyopathy using [18 F]FDG-PET: comparison with cardiac MRI and monitoring erythropoietin therapy. *EJNMMI Res*. 2012;2:43.
4. Cauchon N, Turcotte E, Lecomte R, Hassessian HM, Lier JE. Predicting efficacy of photodynamic therapy by real-time FDG-PET in a mouse tumour model. *Photochem Photobiol Sci*. 2012;11:364-370.
5. Higuchi T, Anton M, Dumler K, et al. Combined reporter gene PET and iron oxide MRI for monitoring survival and localization of transplanted cells in the rat heart. *J Nucl Med*. 2009;50:1088-1094.
6. Higuchi T, Anton M, Saraste A, et al. Reporter gene PET for monitoring survival of transplanted endothelial progenitor cells in the rat heart after pretreatment with VEGF and atorvastatin. *J Nucl Med*. 2009;50:1881-1886.
7. Sharir T, Germano G, Kavanagh PB, et al. Incremental prognostic value of post-stress left ventricular ejection fraction and volume by gated myocardial perfusion single photon emission computed tomography. *Circulation*. 1999;100:1035-1042.
8. White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PW, Whitlock RM, Wild CJ. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation*. 1987;76:44-51.
9. Lorenz JN, Robbins J. Measurement of intraventricular pressure and cardiac performance in the intact closed-chest anesthetized mouse. *Am J Physiol*. 1997;272:H1137-1146.
10. Tanaka N, Dalton N, Mao L, et al. Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. *Circulation*. 1996;94:1109-1117.
11. Hacker M, Hoyer X, Kupzyk S, et al. Clinical validation of the gated blood pool SPECT QBS processing software in congestive heart failure patients: correlation with MUGA, first-pass RNV and 2D-echocardiography. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2006;22:407-416.
12. Hacker M, Stork S, Stratakis D, et al. Relationship between right ventricular ejection fraction and maximum exercise oxygen consumption: a

methodological study in chronic heart failure patients. *J Nucl Cardiol.* 2003;10:644-649.

13. Sibille L, Bouallegue FB, Bourdon A, Micheau A, Vernhet-Kovacsik H, Mariano-Goulart D. Comparative values of gated blood-pool SPECT and CMR for ejection fraction and volume estimation. *Nucl Med Commun.* 32:121-128.

14. Gropler RJ, Beanlands RS, Dilsizian V, Lewandowski ED, Villanueva FS, Ziadi MC. Imaging myocardial metabolic remodeling. *J Nucl Med.* 51 Suppl 1:88S-101S.

15. Higuchi T, Nekolla SG, Jankaukas A, et al. Characterization of normal and infarcted rat myocardium using a combination of small-animal PET and clinical MRI. *J Nucl Med.* 2007;48:288-294.

16. McMurray JJ, Pfeffer MA. Heart failure. *Lancet.* 2005;365:1877-1889.

17. St John Sutton M, Pfeffer MA, Moya L, et al. Cardiovascular death and left ventricular remodeling two years after myocardial infarction: baseline predictors and impact of long-term use of captopril: information from the Survival and Ventricular Enlargement (SAVE) trial. *Circulation.* 1997;96:3294-3299.

18. Bax JJ, Schinkel AF, Boersma E, et al. Early versus delayed revascularization in patients with ischemic cardiomyopathy and substantial viability: impact on outcome. *Circulation.* 2003;108 Suppl 1:II39-42.

19. Kwon DH, Hachamovitch R, Popovic ZB, et al. Survival in patients with severe ischemic cardiomyopathy undergoing revascularization versus medical therapy: association with end-systolic volume and viability. *Circulation.* 2012;126:S3-8.

20. McMurray J, Pfeffer MA. New therapeutic options in congestive heart failure: Part II. *Circulation.* 2002;105:2223-2228.

21. McMurray J, Pfeffer MA. New therapeutic options in congestive heart failure: Part I. *Circulation.* 2002;105:2099-2106.

22. Martinez MJ, Ziegler SI, Beyer T. PET and PET/CT: basic principles and instrumentation. *Recent Results Cancer Res.* 2008;170:1-23.

23. Constantinescu CC, Mukherjee J. Performance evaluation of an Inveon PET preclinical scanner. *Phys Med Biol.* 2009;54:2885-2899.

24. Yang Y, Rendig S, Siegel S, Newport DF, Cherry SR. Cardiac PET imaging in mice with simultaneous cardiac and respiratory gating. *Phys Med Biol.* 2005;50:2979-2989.

- 25.** Ghosh N, Rimoldi OE, Beanlands RS, Camici PG. Assessment of myocardial ischaemia and viability: role of positron emission tomography. *Eur Heart J*. 2010;31:2984-2995.
- 26.** Young LH, Coven DL, Russell RR, 3rd. Cellular and molecular regulation of cardiac glucose transport. *J Nucl Cardiol*. 2000;7:267-276.
- 27.** Stegger L, Heijman E, Schafers KP, Nicolay K, Schafers MA, Strijkers GJ. Quantification of left ventricular volumes and ejection fraction in mice using PET, compared with MRI. *J Nucl Med*. 2009;50:132-138.
- 28.** Wangler C, Wangler B, Lehner S, et al. A universally applicable ⁶⁸Ga-labeling technique for proteins. *J Nucl Med*. 2011;52:586-591.
- 29.** Bennink RJ, van den Hoff MJ, van Hemert FJ, et al. Annexin V imaging of acute doxorubicin cardiotoxicity (apoptosis) in rats. *J Nucl Med*. 2004;45:842-848.
- 30.** Sarda-Mantel L, Hervatin F, Michel JB, et al. Myocardial uptake of ^{99m}Tc-annexin-V and ¹¹¹In-antimyosin-antibodies after ischemia-reperfusion in rats. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008;35:158-165.
- 31.** Thimister PW, Hofstra L, Liem IH, et al. In vivo detection of cell death in the area at risk in acute myocardial infarction. *J Nucl Med*. 2003;44:391-396.
- 32.** De Saint-Hubert M, Prinsen K, Mortelmans L, Verbruggen A, Mottaghy FM. Molecular imaging of cell death. *Methods*. 2009;48:178-187.
- 33.** Lehner S, Todica A, Brunner S, et al. Temporal changes in phosphatidylserine expression and glucose metabolism after myocardial infarction: an in vivo imaging study in mice. *Mol Imaging*. 2012;11:461-470.
- 34.** Rutschow S, Leschka S, Westermann D, et al. Left ventricular enlargement in coxsackievirus-B3 induced chronic myocarditis--ongoing inflammation and an imbalance of the matrix degrading system. *Eur J Pharmacol*. 2010;630:145-151.
- 35.** Klingel K, Hohenadl C, Canu A, et al. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:314-318.
- 36.** Kolk MV, Meyberg D, Deuse T, et al. LAD-ligation: a murine model of myocardial infarction. *J Vis Exp*. 2009.
- 37.** McMurray JJ. Clinical practice. Systolic heart failure. *N Engl J Med*. 2010;362:228-238.

- 38.** van Laake LW, Passier R, Monshouwer-Kloots J, et al. Monitoring of cell therapy and assessment of cardiac function using magnetic resonance imaging in a mouse model of myocardial infarction. *Nat Protoc.* 2007;2:2551-2567.
- 39.** Deindl E, Zaruba MM, Brunner S, et al. G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis. *FASEB J.* 2006;20:956-958.
- 40.** Huber BC, Beetz NL, Laskowski A, et al. Attenuation of cardiac hypertrophy by G-CSF is associated with enhanced migration of bone marrow-derived cells. *J Cell Mol Med.* 2015;19:1033-1041.
- 41.** Brunner S, Huber BC, Weinberger T, et al. Migration of bone marrow-derived cells and improved perfusion after treatment with erythropoietin in a murine model of myocardial infarction. *J Cell Mol Med.* 2012;16:152-159.
- 42.** Brunner S, Winogradow J, Huber BC, et al. Erythropoietin administration after myocardial infarction in mice attenuates ischemic cardiomyopathy associated with enhanced homing of bone marrow-derived progenitor cells via the CXCR-4/SDF-1 axis. *FASEB J.* 2009;23:351-361.
- 43.** Hirose S, Takahashi M, Ogawa R, et al. Erythropoietin attenuates the development of experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2007;21:17-27.
- 44.** Mitsuma W, Ito M, Kodama M, et al. Cardioprotective effects of recombinant human erythropoietin in rats with experimental autoimmune myocarditis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;344:987-994.
- 45.** Theiss HD, Vallaster M, Rischpler C, et al. Dual stem cell therapy after myocardial infarction acts specifically by enhanced homing via the SDF-1/CXCR4 axis. *Stem Cell Res.* 2011;7:244-255.
- 46.** Theiss HD, Gross L, Vallaster M, et al. Antidiabetic gliptins in combination with G-CSF enhances myocardial function and survival after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2013;168:3359-3369.
- 47.** Roubille F, Prunier F, Barrere-Lemaire S, et al. What is the role of erythropoietin in acute myocardial infarct? Bridging the gap between experimental models and clinical trials. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2013;27:315-331.
- 48.** Gross L, Theiss HD, Grabmaier U, et al. Combined therapy with sitagliptin plus granulocyte-colony stimulating factor in patients with acute myocardial infarction - Long-term results of the SITAGRAMI trial. *Int J Cardiol.* 2016;215:441-445.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen Personen bedanken, die mich über die Jahre hinweg tatkräftig unterstützt und gefördert haben und dadurch diese Habilitation erst ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem wissenschaftlichen Lehrer und Mentor, Herrn Prof. Dr. Marcus Hacker, der sowohl meinen beruflichen als auch meinen wissenschaftlichen Werdegang maßgeblich geprägt und gefördert hat. Er hat mir gezeigt, dass Kreativität und Freude an der wissenschaftlichen Arbeit erst durch die Zusammenarbeit verschiedenster Menschen entstehen können, wobei jeder mit seinen Fähigkeiten, Fertigkeiten und Erfahrungen einen wichtigen Beitrag leistet. Auch für die weiterhin andauernde Unterstützung nach seinem Weggang bedanke ich mich ganz herzlich.

Ausdrücklich möchte ich mich auch bei meinem akademischen Lehrer, Herr Prof. Dr. Peter Bartenstein, Direktor der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, bedanken, der seit Beginn meiner Doktorarbeit an der Klinik vor über acht Jahren stets meine wissenschaftliche und klinische Ausbildung jederzeit vorbehaltlos unterstützt und gefördert hat. Auch für die Möglichkeit meinen wissenschaftlichen Horizont zu erweitern möchte ich ihm hiermit danken.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen ehemaligen Oberärzten Herrn Prof. Dr. Christian Ia Fougère und Herrn Prof. Dr. Alexander Haug sowie meinen Oberarztkollegen Herrn Prof. Dr. Thomas Pfluger, Herrn Prof. Dr. Reinhold Tiling und Herrn Prof. Dr. Mayo Weiss, die mir immer beratend zur Seite standen und sich in meiner Assistenzarztzeit immer die Zeit genommen haben, mir das notwendige klinische Wissen zu vermitteln. Ein fundiertes klinisches Wissen und Fachverständnis ist die Grundlage jeder wissenschaftlichen Forschung.

An dieser Stelle möchte ich auch ein Wort des Dankes an alle Mitglieder der AG Nuklearkardiologie und unsere Kooperationspartner richten. Besondere Erwähnung sollen hier Prof. Dr. Stefan Brunner, Mathias Zacherl, Dr. Cajetan

Lang und PD Dr. Christopher Übleis finden. Sie alle haben entscheidende Beiträge zu meiner Forschungsarbeit geleistet und stellen auch weiterhin einen wichtigen Grundpfeiler meiner wissenschaftlichen und auch klinischen Tätigkeit dar.

Auch meinen Fachmentoren Herrn Prof. Dr. Julien Dinkel und Herrn PD Dr. Bruno Huber gebührt mein Dank für ihre Unterstützung bei meinem Habilitationsprojekt.

Ohne unsere Doktoranden wäre die Forschung neben der klinischen Routine nicht zu bewältigen. Deswegen möchte ich mich auch bei ihnen allen Bedanken für die unermüdliche Unterstützung beim Durchführen von Versuchen, beim Auswerten von Ergebnissen und beim Befüllen von endlosen Datenbanken.

Ich möchte mich auch bei allen Kollegen und Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin bedanken, mit denen ich über die Jahre hinweg zusammenarbeiten durfte. Sie haben mich nicht nur auf beruflicher, sondern auch auf persönlicher Ebene entscheidend geprägt. Drei Personen möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen. Herr Dr. Harun Ilhan, Herr Dr. Erik Mille und Herr PD Dr. Guido Böning auf deren Hilfsbereitschaft ich seit über 8 Jahren uneingeschränkt zählen konnte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem ehemaligen Arbeitskollegen und sehr guten Freund Herrn PD Dr. Sebastian Lehner der mich von Anfang an auf meinem beruflichen und persönlichen Werdegang begleitet und immer unterstützt hat. Er war sowohl für mich als auch für alle anderen Assistenten in der Klinik ein Vorbild, dem man gerne nachgeeifert ist. Meine Freude und Begierde an der wissenschaftlichen Arbeit wurden maßgeblich durch unsere Zusammenarbeit geschaffen. Diese fruchtbare Zusammenarbeit hat einen großen Teil zu meiner Habilitationsarbeit beigetragen. Für die weitere Unterstützung trotz Weggang aus der Klinik möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken.

Von ganzem Herzen möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Familie für den Rückhalt, die Unterstützung und das aufgebrachte Verständnis bedanken. Meinen Eltern und Großeltern, die mich durch andauernde Förderung meiner persönlichen Entwicklung und ihren Rückhalt maßgeblich zu dem gemacht haben was ich heute bin, sowie meinen Schwiegereltern für die herzliche Aufnahme in die Familie und die verständnisvolle Unterstützung. Der allerwichtigste Dank gilt jedoch meiner kleinen Familie, nämlich meiner Frau Veronika, meinem Sohn Vincent und meiner Tochter Marlen. Das Maß an Unterstützung, Verständnis, Geduld, Liebe und Freude, dass ich in über 16 Jahren erfahren durfte ist in Worten nicht zu beschreiben. Dafür, liebe Veronika, danke ich dir von ganzem Herzen.